

# Protection, adaptation or cell death as response to toxins

Citation for published version (APA):

Stijns, M. M. J. P. E. (2017). *Protection, adaptation or cell death as response to toxins: Dependence of time and dose*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University.  
<https://doi.org/10.26481/dis.20170915ms>

## Document status and date:

Published: 01/01/2017

## DOI:

[10.26481/dis.20170915ms](https://doi.org/10.26481/dis.20170915ms)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## **Chapter 8**

### **Summary and general discussion**

## 1 Summary and general discussion

### 1.1 Hormesis

The environment is always changing and life on earth has to adapt to the challenges. For example, when oxygen was introduced in the atmosphere, organisms had to adapt by constructing an antioxidant network to cope with oxygen toxicity. One of the adaptive processes is hormesis. In hormesis the adaptive or compensatory response is induced by a relatively subtle challenge of homeostasis by a toxic compound (1-3). Over time many terms have been given to the same phenomenon, the most recent one is from Davies, adaptive homeostasis, which is a physiological adaptation that leads to a (transient) change or expansion of the internal steady state or (transient) disturbance of the homeostatic balance (1).

### 1.2 Time and adaptation

The induction of an adaptive response is dependent on various factors (**Chapter 2**). A lot of factors are important to ensure that an adaptive response is induced (3). First of all, the intrinsic reactivity of a compound is crucial. Some compounds are more potent to induce hormesis than others. Second, a relatively low dose is necessary to induce an adaptive response that protects against a toxic dose of the same compound. Notably, what a low dose is, depends on the compound. Compounds are regarded as hazardous when they elicit a harmful response in a relatively low concentration. It seems that this also applies for the adaptive response. For example, for the hazardous acrolein a low dose of  $0.15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , a concentration lower than  $10 \mu\text{M}$ , already induces 50 % toxicity in A549 cells, whereas for the "relatively safe" silver nanoparticles (AgNPs) a much higher dose of at least  $55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , depending on the physicochemical properties, is needed to achieve a similar effect (4) (**Chapter 4**). Besides the intrinsic reactivity of the compound, also the physicochemical nature of the compounds is involved, acrolein is water soluble and is taken up by cells by passive diffusion, while AgNPs form agglomerates and are taken up by endocytosis and slowly released in the cell's cytoplasm.

Besides the nature of the compound and the dose, time is also crucial in adaptation (**Chapter 2**). An organism often needs time to adapt to a change such as exposure to a toxin. If the duration of exposure is too short or the frequency of exposure too high, there is no time for the adaptive response to be induced. The nature of the adaptive response also determines the time needed. Direct enzyme modification or cofactor regulations are the quickest adaptive responses. Depending on the oxygen level, associated oxidative stress and concomitant glutathione (GSH) levels, the activity of the

rate-limiting enzyme of GSH synthesis can be regulated. Adaptations that need more time are for example the transcriptional increase of the endogenous antioxidant systems including nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)-mediated expression of enzymes involved in GSH synthesis. In the long run, adaptations at the epigenetic and genomic level should be considered; for example, the ability to synthesize GSH by phototrophic bacteria. All these forms of adaptation are encoded in the genome. Although, if for an individual an adaptive response is induced too early or too late, this can be detrimental on a short term, because it costs a lot of energy. Apparently, the ability to adapt is evolutionary beneficial.

### 1.3 Redox signaling in adaptation to acrolein and nanoparticles

In human bronchial epithelial adenovirus 12-SV40 infected (BEAS-2B) cells, GSH is the first line of defense against acrolein (5) (**Chapter 3**). If BEAS-2B cells are exposed to a concentration lower than 3  $\mu\text{M}$ , no cytotoxicity is induced. At these low concentrations, GSH reacts in a stoichiometry of 1:1 with acrolein. At a higher concentration of 10  $\mu\text{M}$ , 80 % of the acrolein does not react with GSH and is free to bind with other cellular targets finally resulting in cell death. This confirms the paradigm that at low doses of acrolein the cells are protected and the GSH system is the main protective mechanism, whereas at high doses toxicity is induced. Next to this, we also showed that acrolein can induce adaptation. Pretreatment of BEAS-2B cells with a relatively low and non-toxic concentration of 3  $\mu\text{M}$ , increases the gene expression of Nrf2-mediated  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma\text{GCS}$ ) leading to elevated GSH levels. This protects against toxicity due to exposure to a relatively high toxic concentration of acrolein of 10  $\mu\text{M}$  3 hours later. Both the GSH protection and adaptation via the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-Nrf2 pathway are induced via a thiol reactive mechanism. The  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde acrolein prefers to react via 1,4 Michael addition with thiols of first of all GSH, but at higher concentrations with thiols present in other proteins, for example the thiol present in cysteine 288 of Keap1 (6). Notably, the characteristic structure of acrolein can also be found in other molecules, therefore acrolein is defined as a toxicophore. It functions as a model for electrophilic xenobiotics that display toxicity as a direct result of their electrophilicity, e.g. N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) (7), a byproduct from the metabolism of acetaminophen or paracetamol.

Acrolein is not the only compound able to induce adaptation. In this thesis, we showed that also silver nanoparticles can induce hormesis in A549 cells (4) (**Chapter 4**). In this study we investigated two types of AgNPs, the first one is AgNP1 and has the biggest size of 37 nm, but a lower solubility. The second one AgNP2 has a size of approximately 16.6 nm and is much better soluble. In addition, the AgNP2 has a greater tendency to

agglomerate, whereas the shape of the AgNP2 is more spherical. The toxicity of AgNP2 appeared to be higher than for AgNP1 and all their physicochemical properties should be taken into account when explaining their difference in toxicity. Both types of silver nanoparticles and acrolein induced adaptation. For AgNP1 and AgNP2, pretreatment with 2.5 or 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectively, resulted in less toxicity induced by 60 or 80  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectively, 24 hours later. For acrolein, adaptation was induced by 10  $\mu\text{M}$  acrolein that protected against toxicity of 100  $\mu\text{M}$  acrolein 4 hours later. Remarkably, A549 cells are more resistant against acrolein toxicity than BEAS-2B cells. The difference in cellular sensitivity is also apparent for other compounds including multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) (8). Furthermore, in A549 cells more Nrf2-mediated upregulation has been seen. Apparently, also the endogenous antioxidant system seems to be different between the two different cell types. Remarkably, the low concentration of acrolein seems to increase GSH levels, increase Nrf2 translocation and increase the expression of endogenous antioxidant genes  $\gamma\text{GCS}$  and heme oxygenase-1 (HO-1). For both AgNPs, no effect on GSH levels and gene expression of  $\gamma\text{GCS}$  was seen, while nuclear presence of Nrf2 and HO-1 gene expression were increased. On the other hand, pretreatment with a low dose of the AgNPs, 2.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  for AgNP1 and 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  for AgNP2, protected against toxicity of a high dose of 100  $\mu\text{M}$  of acrolein. This indicates that AgNPs can induce an adaptive response that apart from protection against a challenge with the compound itself can also protect against a challenge with another compound, in this case acrolein, a process called transhormesis. This can only be explained, when the same adaptive response is induced to induce protection despite of the differences found in the mechanism. The mechanism of how AgNPs induce toxicity is still unknown, although some studies show that they increase reactive oxygen species (ROS) (9).

#### **1.4 Antioxidant flavonoids, protection and mechanism of adaptation**

Flavonoids are polyphenolic compounds present in fruit and vegetables. In this thesis the most abundant natural flavonoids rutin and quercetin are studied. They are able to scavenge ROS, thereby functioning as an antioxidant. During this scavenging they are converted to their oxidized form, called quinone. Due to this antioxidant activity, they protect against the damaging effects of ROS. If ROS are not scavenged, this will lead to oxidative damage to deoxyribonucleic acid (DNA), proteins or lipids (10). However, the quinone form of the flavonoid has been shown to be thiol reactive. Previously, it has been shown that dependent on its structure it prefers to direct its reactivity towards either GSH or vitamin C in the endogenous antioxidant network (11). Due to its rutinoside group, rutin is a much harder electrophile than quercetin. It is thought that rutin quinone probably prefers to react with vitamin C over GSH, because vitamin C is also a much harder nucleophile. According to the Hard Soft Acid Base (HSAB) concept, hard electrophiles

prefer to react with hard nucleophiles and soft electrophiles with soft nucleophiles. GSH and vitamin C are not the only members of the endogenous antioxidant network. In this thesis in **Chapter 5**, we confirmed that rutin functions as an antioxidant decreasing the endogenous level of oxidative stress. The formed rutin quinone can react with thiols present in Keap1 and decrease the activity of the endogenous antioxidant enzyme thioredoxin reductase 1 (TrxR1). This will subsequently lead to an increased Nrf2 activity. In addition, an increased glutamate cysteine ligase (GCL) gene expression was measured in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Next to that, oxidative stress increases proinflammatory nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) activity and pro-angiogenesis hypoxia-inducible factor (HIF) activity. However, rutin quinone is able to blunt this effect. Previously, it was seen that an upregulation of GCL also results in increased GSH levels. This probably explains the adaptive response seen for rutin quinone. And it should be noted that this is a targeted response, since it only happens in regions with oxidative stress. Addition of rutin quinone, 3 hours before a second challenge with oxidative stress, resulted in diminished oxidative stress compared with the condition without rutin quinone pretreatment. This phenomenon of a defined non-harmful compound inducing an adaptive response against a toxic compound, in this case oxidative stress, is called parahormesis (12, 13). To illustrate the physiological relevance of this finding, the effect on the local vasomotor response in vessels was determined. From oxidative stress, it is known that it can impair vasorelaxation of arterioles (14), which was confirmed in secondary human placental arterioles. Pretreatment with rutin protected against oxidative stress-triggered impaired vasorelaxation of human placental arterioles. This can be attributed, firstly, to its direct antioxidant scavenging capacity. However, due to its short half-life the protective effects against development of cardiovascular disease (CVD) cannot be explained. However, the increase in Nrf2-mediated endogenous antioxidants by rutin quinone, can explain the protective effects on a longer time scale. Regarding the vasomotor responses, thiol supplementation has been shown to increase nitric oxide (NO) production. In addition, a previous study, showed that rutin in presence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) could also increase endothelial nitric oxide synthase (eNOS) messenger ribonucleic acid (mRNA) (15) and probably by this way rutin quinone and not rutin can enhance the vasodilatory effects in blood vessels.

### **1.5 Thiol reactivity and adaptation versus amino reactivity and toxicity**

Acrolein, AgNPs and rutin quinone can induce adaptation at low concentrations and exposure times. For acrolein also the effects of high concentrations and increased incubation times were determined (**Chapter 6**). At low concentrations and short incubation times, GSH can protect against damage induced by acrolein. An increased concentration of acrolein and a longer incubation with acrolein activated microsomal

glutathione-S-transferase 1 (MGST1). Acrolein reacts via 1,4 Michael addition with the thiol in cysteine 49. If concentrations of acrolein are too high or longer incubation times are used, next to the thiols also amino groups of MGST1 can be targeted. Targeting of the amino groups results in the formation of a Schiff base or thiazolidine derivative that inhibits MGST1 activity. This indicates that first GSH protects against the damaging effects of acrolein. By activating MGST1, a short term adaptive mechanism is induced. Finally, at too high concentrations or too long incubation times, acrolein overwhelms the cellular systems and can attack vital cellular targets including essential proteins or DNA. This will damage the cell and enhance various oxidative stress-related diseases. In order to protect the cell against this development, it would be beneficial to decrease endogenous protection by inhibiting MGST1 and enhance programmed cell death. This last mechanism is not substantiated in **Chapter 6**, but will be explained in more detail in the next paragraph.

### 1.6 Apoptosis, a mechanism of toxicity or protection?

Next to rutin quinone also quercetin quinone can induce adaptation by increasing Nrf2 activity. In addition, quercetin quinone decreases NF- $\kappa$ B and HIF activity induced by oxidative stress.

Remarkably, in tumor cells, in this case GSH-depleted A375 melanoma cells, quercetin quinone decreases Nrf2-mediated expression of endogenous antioxidant genes (**Chapter 7**). In addition, also the activity of TrxR1 is decreased. At the same time, quercetin quinone induces apoptosis, while oxidative stress results in necrosis. Additionally, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) nuclear translocation is increased, which coincides with a trend towards increased ratio of pro-apoptotic versus anti-apoptotic gene expression (**Chapter 7**). A375 melanoma cells that are simultaneously exposed to high oxidative stress and quercetin show an inhibition of Nrf2-mediated adaptation and shift cell death from oxidative stress-induced necrosis to apoptosis. This indicates that, if a cell is exposed to high levels of oxidative stress, in this case a tumor cell, instead of protecting a cell undergoing a lot of damage to essential proteins or DNA, programmed cell death or apoptosis is induced. This is of course toxic for the cell, but protects the living organism against the detrimental effects of damaged, not properly functioning, cells. This is again a targeted approach, since quercetin is only converted into quercetin quinone in regions with oxidative stress and for example in tumor cells Nrf2, TrxR1 and GAPDH are upregulated.

## 2 Implications, limitations and recommendations for future research

More understanding of our ability to adapt, and especially in the context of time, will enhance our understanding of how organisms are able to adapt their intricate redox signaling. With this knowledge, we can intervene in this process and at the right time enhance adaptation to ensure that organisms can better cope with encountered changes in the environment. They are better protected against oxidative challenges disturbing their internal redox balance and thereby less likely to develop associated oxidative stress-related diseases like chronic obstructive pulmonary disease (COPD), CVD and cancer. We described the current knowledge about the concept of time in adaptive processes. This knowledge is however not complete, especially, regarding adaptive processes on a long term knowledge is lacking. For example, are we able to limitless induce adaptive processes or are we getting used to the exposure at a certain time and does our ability to adapt fade out, and does a kind of desensitization occur? Additionally, also the mechanisms of adaptation seem to be similar for some chemicals, e.g. acrolein and silver nanoparticles, but which chemicals can induce an adaptive response that also protect against each other? Is this for all chemicals similar or do different compounds induce different mechanisms of adaptation and are they then still able to induce transhormesis? Both questions need further investigation. In addition, the concept of hormesis is currently not included in risk assessment legislation of toxic compounds. It could be investigated whether we need to increase our threshold limit value (THV) or acceptable daily intake (ADI) for compounds, to make sure that adaptive processes are included to protect against future exposures. The major limitation of this process is however, that inducing adaptation costs energy and this energy is spilled if we are not exposed to a future challenge. However, we cannot always predict when we will be exposed to a future challenge.

As the mechanism of adaptation for acrolein and AgNPs is found to be similar, it remains enigmatic what is causing this adaptation. In order to determine whether in both cases a Nrf2-mediated mechanism causes these adaptations induced by acrolein or AgNPs, a Nrf2 knock out study should be performed. Furthermore, the finding that not all Nrf2-mediated genes are activated by the investigated compounds, can be due to the fact that either not all coactivators are present for the specific gene, also other transcription factors are involved in up- or downregulation of this specific gene or epigenetic changes are induced. Also timing can play an important role, since GSH seems to be more important in the more short term responses to acrolein, whereas due to long term exposures to AgNPs also HO-1 gene expression is induced. It is still questioned whether hormesis and



transhormesis are also applicable for other nanoparticles (NPs) including titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) or gold nanoparticles (AuNPs).

Also rutin quinone can induce an adaptive response by increasing expression of Nrf2-mediated endogenous antioxidants. The effects of the rutin quinone have only been shown indirectly. Again, with a Nrf2 knock out model, the causal effect of Nrf2 could be investigated. Additionally, it is recommended to show rutin quinone formation and adduct formation on specific proteins e.g. Keap1 intracellular. Previous attempts to find these adducts, encountered difficulties regarding low expression of Keap1 in the examined cell types or low stability with regard to the formed adduct. Keap1 overexpression and non-reducing gels are recommended to be used in future experiments. Furthermore, it is recommended to investigate adaptation in blood vessels, by preincubating them with rutin quinone and over time investigating the vasomotor responses after an exposure to oxidative stress a few hours later. Also, it would be interesting to elaborate the found effect for rutin quinone, by investigating endothelial monolayer integrity (vascular leakage) by measuring the electrical resistance using Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) (16). This could link the redox-induced vascular effects with inflammation. However, it should be noted that rutin quinone probably more selectively targets proteins in the cell than the damaging ROS. One of these targets could be Keap1, which acts as a sensor for specific compounds. Acrolein has been shown to selectively target cysteine 288, just like other alkenal-like substrates as 4-hydroxy-2-nonenal, whereas rutin quinone binds to cysteine 151 (6). Cysteine 288 is present in the intervening region, probably resulting in a conformational change impairing interaction with Nrf2, while cysteine 151 is located in the Bric-à-Brac (BTB) domain of Keap1 that is involved in the homodimerization of the Keap1 dimer and binding to cytoplasmic cytoskeleton (17). In both cases, adduct formation interferes with Keap1's interaction with Nrf2 and influences the downstream activation of endogenous antioxidant genes. But the subset of cysteines that is attacked in Keap1 is probably compound-dependent. Next to the effects on Keap1, also the GSH level could be determined over time and the resulting effect on NO production due to rutin quinone should be confirmed. Finally, the newly found mechanism behind the long term protection of rutin against CVD, the selective upregulation of endogenous antioxidant systems, can in the future contribute to the further understanding why rutin can reduce the risk on developing cardiovascular disease. Additionally, the induction of adaptation could also be examined for other flavonoids, with a small difference in their structure. It could be questioned whether this difference in hardness, leads to more potent adaptation and more stable adducts with Keap1.

Regarding the acrolein modification of MGST1, it could be questioned whether it is indeed only the amino group binding that leads to inhibition of MGST1. Capping of

amino reactive groups before acrolein treatment at high concentrations or long incubation times could answer this question. In addition, amino reactive compounds can confirm that binding to amino groups leads to MGST1 inhibition. Finally, the specific amino group-mediated inhibition of MGST1 should be validated in tumor cells to investigate the protection against established anticancer drug resistance by inhibiting MGST1 capacity of detoxifying anticancer drugs. Maybe in this case, acrolein is not a good compound to use, but flavonoid quinones could be considered. With regard to this, the dietary flavonoids function as a therapeutic and can be seen as nutraceutical.

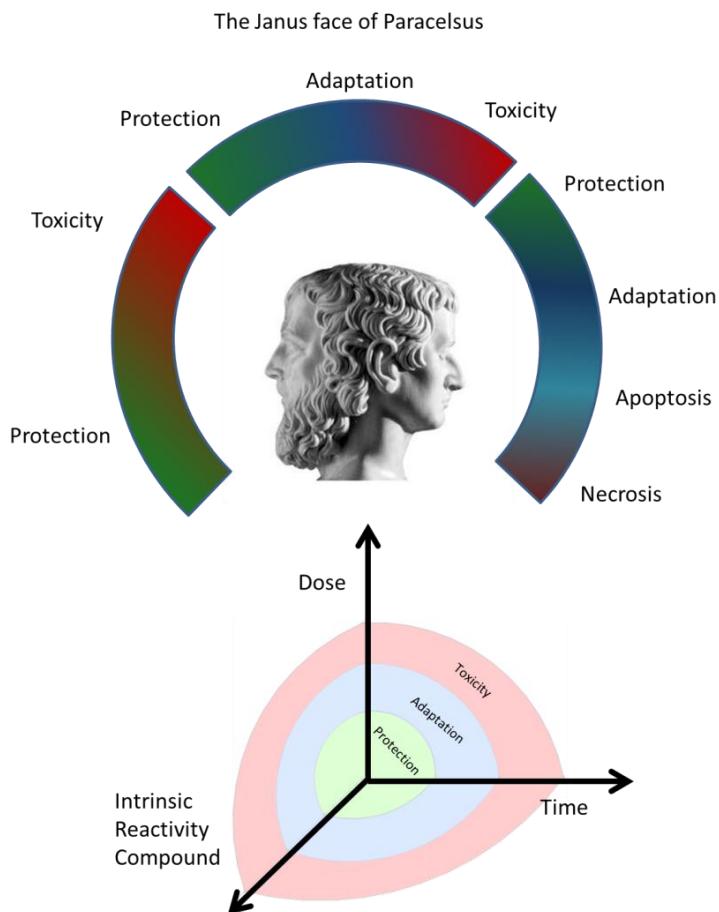
Regarding the apoptosis-inducing effects of quercetin quinone, the causal effect of GAPDH inducing apoptosis could be investigated in a (temporarily) nuclear GAPDH knock out model. In addition, the GAPDH-quercetin adduct should be examined intracellular.

Finally, there are some indications that these hormetic responses occur in an *in vivo* setting. For example chronic smokers have higher GSH levels in their lung epithelial lining fluid than non-smokers or acute smokers (18). However, it should be confirmed that exposure to a low dose of a specific compound protects against a second challenge with the same or another compound. The risk assessment might change as a result of this. The societal impact will undoubtedly raise some ethical concerns.

### 3 Conclusion

The paradigm Paracelsus has evolved over time (Figure 1). Looking back he suggested in 1500: 'Sola dosis facit venenum' (in English: The dose makes the poison), meaning that every compound or toxin will be toxic, depending on the dose. At a low dose, defense systems in our body can offer protection for example the redox systems GSH and thioredoxin (Trx). At a dose that is too high, the protection systems are overwhelmed and the compound will induce toxic effects. In this thesis we refined the paradigm of Paracelsus by adding an additional level to the continuum between protection and toxicity: the level of adaptation. If the dose of the chemical is approaching the border of toxicity, the protection systems are not 100 % full proof, and the toxin selectively targets specific pathways that induce adaptation and contribute to an enhanced protection on a longer term, for example a transcriptional increase of endogenous antioxidant enzymes. That is the current paradigm, which is also illustrated by some of the research in this thesis. This paradigm will further develop over time. We expect that in the future, probably additional levels and sublevels will be defined. For example the level of toxicity can already be subdivided in apoptosis and necrosis. Some compounds enhance apoptotic processes e.g.

quercetin quinone, whereas others induce necrosis for example  $\text{H}_2\text{O}_2$  that contributes to oxidative stress.



**Figure 1: The Janus face of Paracelsus: the paradigm of Paracelsus, “Sola dosis facit venenum”, evolved over time, taken into account dose, time and the intrinsic reactivity of the compound of interest.**

Also another dimension might be added that relates to the reactivity of compounds. The nature of the compound of interest is a dimension that should be taken into account in this paradigm. One of the strategies in toxicology to protect is to neutralize the reactivity of the toxin of interest. For example, initially it was attempted to completely annihilate the reactivity of ROS by an antioxidant. While in the current paradigm, reactivity can be selectively directed. For example, the reactivity of ROS is not only

annihilated by an antioxidant like quercetin, but quercetin is converted into quercetin quinone by ROS that can selectively induce adaptation by upregulation of the endogenous antioxidant systems to protect in the future against the damaging ROS. Depending on the circumstances, adaptation or toxicity can be regarded as beneficial or detrimental. Enhancing adaptation by increasing the endogenous antioxidant response in a tumor is not desirable, whereas toxicity, especially induction of apoptosis, could be advantageous in a cancer cell. However, how this paradigm will evolve in the upcoming future and what we could do to intervene in these processes will need to be seen. *Tempus omnia revelat.*

## 4 References

1. Davies KJ. Adaptive homeostasis. *Mol Aspects Med.* 2016 Jun;49:1-7.
2. Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing research reviews.* 2008 Jan;7(1):1-7.
3. Sthijns MM, Weseler AR, Bast A, Haenen GR. Time in Redox Adaptation Processes: From Evolution to Hormesis. *International journal of molecular sciences.* 2016 Sep 29;17(10).
4. Sthijns MM, Thongkam W, Albrecht C, Hellack B, Bast A, Haenen GR, et al. Silver nanoparticles induce hormesis in A549 human epithelial cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* 2017 Jan 18.
5. Sthijns MM, Randall MJ, Bast A, Haenen GR. Adaptation to acrolein through upregulating the protection by glutathione in human bronchial epithelial cells: the materialization of the hormesis concept. *Biochemical and biophysical research communications.* 2014 Apr 18;446(4):1029-34.
6. McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, Hayes JD. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 02;107(44):18838-43.
7. Nassini R, Materazzi S, Andre E, Sartiani L, Aldini G, Trevisani M, et al. Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2010 Dec;24(12):4904-16.
8. Ursini CL, Cavallo D, Freseigna AM, Ciervo A, Maiello R, Buresti G, et al. Differences in cytotoxic, genotoxic, and inflammatory response of bronchial and alveolar human lung epithelial cells to pristine and COOH-functionalized multiwalled carbon nanotubes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:359506.
9. Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S, Moreau K, Baeza-Squiban A, Gaiser BK, et al. An in vitro assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrol.* 2013 Apr 25;14:96.
10. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, et al. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med.* 2011 Jun 01;34(3):E163-71.

11. Jacobs H, Moalin M, Bast A, van der Vijgh WJ, Haenen GR. An essential difference between the flavonoids monoHER and quercetin in their interplay with the endogenous antioxidant network. *PLoS One*. 2010 Nov 08;5(11):e13880.
12. Ursini F, Maiorino M, Forman HJ. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox biology*. 2016 Aug;8:205-15.
13. Forman HJ, Davies KJ, Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free radical biology & medicine*. 2014 Jan;66:24-35.
14. Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum TW, et al. Upregulation of arginase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006 Sep;26(9):2035-42.
15. Ugusman A, Zakaria Z, Chua KH, Nordin NA, Abdullah Mahdy Z. Role of rutin on nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:169370.
16. van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, ten Klooster JP, et al. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2002 May 01;115(Pt 9):1837-46.
17. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology*. 2013 Jan 18;1:45-9.
18. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277(6 Pt 1):L1067-88.



## **Chapter 9**

### **Nederlandse samenvatting en algemene discussie**



## 1 Nederlandse samenvatting en algemene discussie

### 1.1 Hormesis

De omgeving is altijd aan verandering onderhevig en het leven op aarde moet zich voortdurend aanpassen aan deze veranderingen. Bijvoorbeeld toen zuurstof voor het eerst in de atmosfeer kwam, moesten organismen zich aanpassen door een antioxidant netwerk te creëren dat beschermt tegen deze zuurstof toxiciteit. Een van deze adaptieve processen heet hormesis. Tijdens hormesis wordt een adaptieve of compensatoire respons geïnduceerd door een relatief subtiele verstoring van homeostase met een toxische stof. (1-3). Er bestaan verschillende termen voor het concept hormesis. De meest recente is gedefinieerd door Davies. Davies suggereerde de term adaptieve homeostase. Dit is een fysiologische adaptatie die resulteert in een (tijdelijke) verandering of uitbreiding van het interne evenwicht of homeostase (1).

### 1.2 Tijd en aanpassing

Verschillende factoren kunnen het induceren van adaptatie beïnvloeden (3) (**Hoofdstuk 2**). Allereerst, is de intrinsieke reactiviteit van een stof cruciaal. Sommige stoffen zijn beter in het induceren van adaptatie dan andere stoffen. Ten tweede, is de dosis belangrijk. Een relatief lage dosis is nodig om adaptatie te induceren. Door zich aan te passen is het organisme vervolgens beschermd tegen blootstelling met een toxische dosis van de desbetreffende stof. Notabene, wat gedefinieerd wordt als een lage dosis, is afhankelijk van de desbetreffende stof. Van toxische stoffen is er absoluut een lagere concentratie nodig om adaptatie te induceren. Bijvoorbeeld, acroleïne, een stof in sigarettenrook, induceert al 50 % toxiciteit in A549 cellen bij een concentratie van  $0.15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  of  $10 \mu\text{M}$ . Terwijl zilver nanodeeltjes (AgNPs), afhankelijk van hun fysisch-chemische eigenschappen, pas bij een concentratie van  $55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  een vergelijkbaar effect geven (4) (**Hoofdstuk 4**). Naast de intrinsieke reactiviteit van de stof, zijn ook de fysisch-chemische eigenschappen betrokken. Acroleïne is wateroplosbaar en wordt opgenomen in de cel via passieve diffusie, terwijl AgNPs kunnen agglomereren en opgenomen worden via endocytose en pas langzaam vrijkomen in het cytoplasma.

Behalve de aard van de stof en de dosis, is ook de tijd cruciaal tijdens adaptatie (**Hoofdstuk 2**). Een organisme heeft tijd nodig om zich te kunnen aanpassen aan een verandering, bijvoorbeeld aan de blootstelling aan een toxische stof. Als de blootstellingsduur te lang is of de frequentie van de blootstellingen te hoog, dan is er geen tijd om de adaptieve respons te induceren. De aard van de adaptieve respons bepaalt hoeveel tijd er nodig is om de adaptatie te kunnen doen. De snelste adaptieve responsen

zijn directe enzymmodificaties en cofactor regulaties. Het snelheidsbepalende enzym van de glutathion (GSH) synthese wordt gereguleerd door de zuurstofspanning, geassocieerde oxidatieve stress en daarmee gepaard gaande GSH concentraties. Adaptaties waar meer tijd voor nodig is, zijn bijvoorbeeld een endogene toename in antioxidantsystemen op transcriptie niveau zoals nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)-gemedieerde expressie van enzymen betrokken bij de GSH synthese. Op lange termijn zijn adaptaties met uitwerkingen op epigenetisch en genetisch niveau van belang; zoals de mogelijkheid van fototrofe bacteriën om GSH te synthetiseren. Al deze vormen van adaptatie liggen opgeslagen in het genoom. Voor een individu kan een adaptieve respons te vroeg of te laat zijn, met schadelijke effecten op de korte termijn, omdat veel energie wordt verbruikt. Echter de mogelijkheid om je aan te passen blijkt evolutionair voordelig.

### 1.3 Redox signalering in adaptatie tegen acroleïne en nanodeeltjes

In humane bronchiale epitheliale adenovirus 12-SV40 geïnfecteerde (BEAS-2B) cellen, vormt GSH de eerste verdediging tegen acroleïne (5) (**Hoofdstuk 3**). Een concentratie van acroleïne lager dan 3  $\mu\text{M}$  geeft dan ook geen cytotoxiciteit, omdat GSH in een stoichiometrie van 1:1 met acroleïne reageert. Echter bij een concentratie van 10  $\mu\text{M}$  acroleïne, reageert 80 % van het acroleïne niet met GSH, maar met andere cellulaire onderdelen zoals proteïnen, hetgeen uiteindelijk resulteert in celdood. Dit bevestigt het paradigma dat cellen beschermd zijn tegen lage dosissen van acroleïne en dat GSH het belangrijkste beschermingsmechanisme is, terwijl een hoge dosis aan acroleïne tot toxiciteit leidt. Daarnaast, hebben we ook laten zien dat acroleïne tot adaptatie kan leiden. Voorbehandeling van BEAS-2B cellen met een relatief lage niet toxische concentratie acroleïne van 3  $\mu\text{M}$  resulteert in een toename in gen expressie van Nrf2-gemedieerde  $\gamma$ -glutamylcysteïne synthetase ( $\gamma\text{GCS}$ ) dat de GSH levels laat stijgen. Dit beschermt vervolgens tegen de toxiciteit als gevolg van de blootstelling aan een relatieve hoge concentratie aan acroleïne van 10  $\mu\text{M}$  3 uur later. Zowel de bescherming door GSH als de adaptatie via de Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-Nrf2 pathway worden geïnduceerd via een thiol reactief mechanisme. Het  $\alpha,\beta$  onverzadigde aldehyde acroleïne reageert met thiolen zoals GSH via een 1,4 Michaël additie. Allereerst reageert acroleïne met GSH, maar bij hogere concentraties aan acroleïne zullen ook andere thiolen zoals het thiol in cysteïne 288 van Keap1 reageren (6). Daarbij komt nog dat de karakteristieke structuur van acroleïne ook herkenbaar is in de structuur van andere moleculen. Daarom wordt acroleïne ook wel een toxicofoor genoemd. Het functioneert als een model stof voor electrofiele xenobiotica die toxisch zijn vanwege hun electrofiele eigenschappen. Een voorbeeld hiervan is N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) (7), een metaboliet in het metabolisme van paracetamol.

Acroleïne is niet de enige stof die adaptatie kan induceren. In deze thesis hebben we laten zien dat ook AgNPs hormesis kunnen induceren in A549 cellen (4) (**Hoofdstuk 4**). In deze studie, hebben we twee verschillende types AgNPs onderzocht. De eerste is AgNP1, die met 37 nm het grootste is en een lage oplosbaarheid heeft. De tweede is AgNP2. Dit nanodeeltje is 16.6 nm groot en heeft een veel betere oplosbaarheid dan AgNP1. Daar komt nog bij dat AgNP2 een grotere neiging tot agglomeratie heeft en een rondere vorm heeft. De toxiciteit van AgNP2 is groter dan de toxiciteit van AgNP1. Daarom moeten ook alle fysisch-chemische eigenschappen worden meegenomen om het verschil in toxiciteit te verklaren. Zowel beide types AgNPs als acroleïne induceren adaptatie. Voorbehandeling met  $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  AgNP1 of  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  AgNP2 leidt ertoe dat  $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  AgNP1 of  $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  AgNP2 24 uur later minder toxisch is dan zonder voorbehandeling. Hetzelfde geldt voor acroleïne:  $10 \mu\text{M}$  acroleïne beschermt tegen blootstelling aan  $100 \mu\text{M}$  acroleïne 4 uur later. A549 cellen zijn echter veel beter beschermd tegen de toxiciteit geïnduceerd door acroleïne dan BEAS-2B cellen. Dit verschil in gevoeligheid van de verschillende celtypen is al eerder gezien voor andere stoffen zoals multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) (8). A549 cellen blijken een hogere activatie van Nrf2-gemedieerde antioxidant systemen te hebben dan BEAS-2B cellen. In A549 cellen leidt een relatief lage concentratie aan acroleïne tot een toename in GSH levels, meer Nrf2 nucleaire translocatie en een toename in expressie van  $\gamma\text{GCS}$  and heme oxygenase-1 (HO-1), twee endogene antioxidant genen. De AgNPs hadden geen effect op GSH levels en gen expressie van  $\gamma\text{GCS}$ . De aanwezigheid van Nrf2 in de nucleus en HO-1 gene expressie waren wel toegenomen. Voorbehandeling met een lage concentratie AgNPs,  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  AgNP1 of  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  AgNP2, beschermde ook tegen blootstelling aan een hoge concentratie acroleïne van  $100 \mu\text{M}$ . Dit geeft aan dat AgNPs een adaptieve respons induceren die niet alleen beschermt tegen de stof zelf, maar ook tegen andere stoffen, in dit geval acroleïne, waar aannemelijk een vergelijkbaar adaptief beschermingsmechanisme aan ten grondslag ligt. Dit laatste, dat blootstelling aan een lage concentratie van de ene stof beschermt tegen een hoge concentratie van een andere stof, hebben wij gedefinieerd als transhormesis. Het mechanisme hoe AgNPs tot toxiciteit kunnen leiden is nog steeds niet volledig bekend. Sommige studies laten zien dat AgNPs de vorming van reactieve zuurstof deeltjes (ROS) kunnen induceren (9).

### **1.4 Antioxidant flavonoiden, bescherming en het mechanisme van adaptatie**

Flavonoiden zijn polyfenolen die aanwezig zijn in groente en fruit. In deze thesis, zijn de meest voorkomende flavonoiden rutine en quercetine bestudeerd. Ze kunnen ROS wegvangen en fungeren hierbij als antioxidant. Door het wegvangen van ROS worden ze omgezet in hun geoxideerde vorm, het zogenaamde flavonoid quinone. Hierdoor beschermen ze tegen de schadelijke effecten van ROS. Als de ROS niet worden

weggevangen, leidt dit tot schade aan deoxyribonucleïnezuur (DNA), proteïnen of lipiden (10). De quinone vorm van het flavonoid is thiol reactief. Afhankelijk van de structuur reageert het quinone hetzij met GSH of vitamine C binnen het endogeen antioxidant netwerk (11). Door de rutinose groep, is rutine een veel hardere elektrofiel dan quercetine. Daardoor zal rutine veel liever met vitamine C reageren dan met GSH, omdat vitamine C ook een veel hardere nucleofiel is. Harde elektrofielen reageren namelijk liever met harde nucleofielen en zachte elektrofielen met zachte nucleofielen volgens het Hard Zacht Zuur Base (HSAB) concept. GSH en vitamine C zijn niet de enige endogene antioxidanten. In deze thesis, in **Hoofdstuk 5**, hebben we de antioxidant werking van rutine bevestigd, omdat deze tot minder endogene oxidatieve stress leidt. Het gevormde rutine quinone kan vervolgens met thiolen in Keap1 reageren en de activiteit van het endogene antioxidant enzym thioredoxin reductase 1 (TrxR1) verminderen. Dit zal vervolgens tot een toename van de Nrf2 activiteit leiden. Ook werd een stijging gemeten in de gen expressie van glutamaat cysteine ligase (GCL) in de humane navelstreng ader endotheel cellen (HUVECs). Verder, liet oxidatieve stress de proinflammatoire activiteit van nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) en pro-angiogenetische activiteit van hypoxia induceerbare factor (HIF) toenemen. Rutine quinone kon de inductie van Nf-κB en HIF voorkomen. Eerder is aangetoond dat een verhoogd GCL level leidt tot een toename in GSH hoeveelheden. Dit kan de adaptieve respons als gevolg van rutine quinone verklaren. Bovendien is deze respons doelgericht, omdat deze alleen plaatsvindt wanneer er oxidatieve stress is. Wanneer cellen worden blootgesteld aan rutine quinone en 3 uur later aan oxidatieve stress, wordt er minder oxidatieve stress gemeten dan wanneer de cellen niet zijn voorbehandeld met rutine quinone, maar alleen zijn blootgesteld aan oxidatieve stress. Het fenomeen dat een algemeen aanvaarde niet schadelijke stof een adaptieve respons induceert die beschermt tegen een toxische stof, in dit geval beschermt rutine quinone tegen oxidatieve stress, wordt parahormesis genoemd (12, 13). Om de fysiologische relevantie van dit fenomeen aan te tonen, is het effect van rutine op de vasomotor respons in bloedvaten onderzocht. Het is bevestigd dat oxidatieve stress de vasorelaxatie van arteriolen verminderd (14). Voorbehandeling van humane arteriolen van de placenta met rutine voorkwam de verminderde vasorelaxatie door oxidatieve stress. Dit is ten eerste te wijten aan de directe antioxidant activiteit van rutine. Deze directe antioxidant activiteit kan echter niet de langdurige beschermende werking van rutine in cardiovasculaire ziektes (CVD) verklaren, omdat rutine maar een korte halfwaardetijd heeft. Ten tweede, induceert rutine quinone protectie op langere termijn door de transcriptie van Nrf2-gemedieerde endogene antioxidanten te verhogen. Verder wordt de vasomotor respons van de vaten bevorderd door te supplementeren met thiolen hetgeen stikstofoxide (NO) productie promoot. Bovendien, is al eerder aangetoond dat de combinatie van rutine en waterstofperoxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) endotheel stikstofoxide synthase (eNOS) messenger ribonucleïnezuur (mRNA) laat toenemen (15). Dit effect is

waarschijnlijk te wijten aan rutine quinone en niet aan rutine en resulteert uiteindelijk in meer vasorelaxatie van bloed vaten.

### 1.5 Thiol reactiviteit en adaptatie versus amino reactiviteit en toxiciteit

Acroleïne, AgNPs en rutine quinone kunnen adaptatie induceren bij lage concentraties en kortdurende blootstelling. Voor acroleïne hebben we ook gekeken naar de effecten van een hoge concentratie acroleïne of een lange incubatietijd (**Hoofdstuk 6**). Bij blootstelling aan een lage concentratie acroleïne of bij een korte incubatietijd, beschermt GSH tegen de schade geïnduceerd door acroleïne. Wanneer de concentratie verhoogd wordt, of de incubatietijd toeneemt, zal acroleïne het microsomale glutathion-S-transferase 1 (MGST1) activeren. Acroleïne reageert dan via 1,4 Michaelis additie met het thiol in cysteïne 49 van MGST1. Maar wanneer de concentratie van acroleïne te hoog is of de incubatietijd te lang, zal acroleïne naast de thiolen ook met de amino groepen van MGST1 reageren. Er wordt dan een Schiff base of thiazolidine derivaat gevormd, dat leidt tot remming van het MGST1 enzym. Dit geeft opnieuw aan dat GSH de eerste verdediging is tegen acroleïne. Door MGST1 te activeren wordt een adaptieve respons geïnduceerd met effecten op korte termijn. Maar wanneer de concentratie van acroleïne te hoog is of de incubatietijd te lang, dan raken de cellulaire beschermingssystemen verzadigd en zal acroleïne met de vitale onderdelen van de cel reageren zoals proteïnen of DNA. Dit zal tot schade leiden en bijdragen aan de ontwikkeling van oxidatieve stress-gerelateerde ziekten. Om de ontwikkeling van deze ziektes te voorkomen, is het waarschijnlijk voordeliger voor het organisme om de endogene bescherming door MGST1 te verminderen en de activiteit van het enzym te verlagen door een reactie met de amino groepen van het enzym te stimuleren en celdood te bevorderen. Dit laatste mechanisme zal verder worden uitgelegd in de volgende paragraaf.

### 1.6 Apoptose, een mechanisme van toxiciteit of bescherming?

Naast rutine quinone geeft ook quercetine quinone adaptatie door Nrf2 activiteit te bevorderen. Daarnaast, kan quercetine quinone NF- $\kappa$ B en HIF activiteit geïnduceerd door oxidatieve stress ook verminderen.

In tegenstelling met normale cellen, geeft quercetine quinone in tumorcellen, in dit geval GSH-gedepleteerde A375 melanoma cellen, een afname in plaats van een toename in expressie van Nrf2-gemedieerde endogene antioxidant genen (**Hoofdstuk 7**). Ook vermindert quercetine quinone de activiteit van TrxR1. Tegelijkertijd, leidt blootstelling aan quercetin quinone tot meer apoptose, terwijl oxidatieve stress necrose induceert. Ook induceert quercetin quinone een toegenomen hoeveelheid glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase (GAPDH) in de kern dat gepaard gaat met

toenemende trend in de ratio van expressie van pro- ten opzichte van anti-apoptotische genen (**Hoofdstuk 7**). A375 melanoma cellen die tegelijkertijd blootgesteld zijn aan oxidatieve stress en quercetine laten een remming van de Nrf2-gemedieerde adaptatie zien en een verschuiving in celdood van oxidatieve stress-geïnduceerde necrose naar apoptose. Dit onderbouwt dat quercetine in een cel die blootgesteld is aan veel oxidatieve stress, een tumor cel, in plaats van de cel te beschermen tegen schade aan essentiële proteïnen of DNA, geprogrammeerde celdood of apoptose induceert. Dit is natuurlijk toxisch voor de cel, maar beschermt het organisme tegen de schadelijke effecten van beschadigde, niet goed functionerende cellen. Dit is een doelgericht effect van quercetine, omdat het alleen gebeurt wanneer er veel oxidatieve stress is bijvoorbeeld in tumorcellen waar onder andere ook meer Nrf2, TrxR1 en GAPDH is dan in normale cellen.

## 2 Implicaties, limitaties en aanbevelingen voor toekomstig onderzoek

Meer kennis van onze mogelijkheid om ons aan te passen en de rol van de tijd hierin, zal ons begrip vergroten hoe organismen hun redox signalering aan kunnen passen. Door deze kennis zouden we kunnen interfereren en sturen in dit proces om op het juiste moment adaptatie, de mogelijkheden van het organisme om zich aan te passen aan de veranderingen in de omgeving, te bevorderen. Hoe beter een organisme beschermd is tegen oxidatieve stress, des te minder kans is er dat dit de interne redox balans verstoort en zich oxidatieve stress-gerelateerde ziekten ontwikkelen zoals chronisch obstructive pulmonary disease (COPD), CVD of kanker. In deze thesis hebben we de huidige kennis van tijd in adaptatie uitgewerkt. Met name met betrekking tot adaptatie op de lange termijn is nog niet alles bekend en kan nog veel onderzocht worden. Bijvoorbeeld kunnen we onbeperkt adaptatie induceren of raken we gewend aan een bepaalde blootstelling en verdwijnt onze mogelijkheid om ons aan te passen op termijn? Vindt er desensitizatie plaats? Het mechanisme van adaptatie is vergelijkbaar voor sommige chemicaliën zoals acroleïne en AgNPs. Maar welke chemicaliën kunnen een adaptieve respons induceren die ook beschermt tegen een andere stof? Is dit voor alle stoffen hetzelfde? Of zijn er ook verschillende mechanismen van adaptatie die door verschillende stoffen worden geïnduceerd en kunnen deze stoffen dan nog steeds transhormesis induceren? Om deze vragen te beantwoorden is er verder onderzoek nodig. Bovendien is het concept van hormesis op dit moment nog niet opgenomen in de wetgeving over risico evaluatie van toxische stoffen. Moeten we onze drempel limiet waarde (THV) of acceptabele dagelijkse inname (ADI) voor stoffen verhogen om er zeker van te zijn dat adaptatie wordt geïnduceerd die vervolgens beschermt tegen toekomstige blootstellingen. De grootste beperking van adaptatie is dat het energie kost, die verspild is wanneer we in de toekomst

niet worden blootgesteld. En of we in de toekomst worden blootgesteld aan een toxische stof kunnen we ook niet altijd voorspellen.

Deze thesis heeft aangetoond dat het mechanisme dat adaptatie veroorzaakt vergelijkbaar is voor acroleïne en AgNPs. Echter welk mechanisme hier precies aan ten grondslag ligt, is nog onduidelijk. Wel is zowel voor acroleïne als AgNPs gevonden dat Nrf2 hierbij betrokken is. Om te bevestigen dat Nrf2 de adaptatie geïnduceerd door acroleïne of AgNPs veroorzaakt, zou een Nrf2 knock out studie moeten worden uitgevoerd. De bevinding dat verschillende stoffen verschillende Nrf2 gereguleerde genen activeren, kan worden verklaard doordat er waarschijnlijk verschillende transcriptiefactoren betrokken zijn bij de regulatie van een bepaald gen. Verder kunnen epigenetische processen een rol spelen en is de tijd van belang. Immers, GSH schijnt belangrijk te zijn in de korte termijn bescherming tegen acroleïne, terwijl op langere termijn HO-1 expressie wordt geïnduceerd. Verder is het aanbevolen om het principe van hormesis en transhormesis ook voor andere nanodeeltjes (NPs) zoals titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) of goud nanodeeltjes (AuNPs) te verifiëren.

Rutine quinone kan ook adaptatie induceren door de expressie van Nrf2-gemedieerde endogene antioxidanten te stimuleren. De effecten van rutine quinone zijn echter alleen indirect aangetoond. Om een oorzakelijk effect van Nrf2 in de rutine quinone geïnduceerde adaptatie te kunnen bevestigen, is verder onderzoek met een Nrf2 knock out model noodzakelijk. Verder is het aan te raden de rutine quinone vorming en adduct vorming met specifieke proteïnen zoals Keap1 intracellulair aan te tonen. Toekomstige experimenten moeten rekening houden met het lage expressie level van Keap1 en niet-reducerende gels zouden toegepast moeten worden om te voorkomen dat het adduct tijdens het experiment verbroken wordt. Toekomstig onderzoek zou zich ook kunnen richten op het aantonen van adaptatie in bloedvaten, door ze voor te behandelen met rutine quinone en een paar uur later bloot te stellen aan oxidatieve stress, waarna de effecten op de vasomotor respons gemeten kunnen worden. Tot slot, zou het erg interessant zijn om het gevonden effect voor rutine quinone uit te breiden door de endotheel monolayer integriteit (of vasculaire lekkage) te meten met behulp van elektrisch cel-substraat bioïmpedantie detectie (ECIS) (16). Hiermee kunnen de redox-geïnduceerde vasculaire effecten gekoppeld worden aan inflammatie. Een kanttekening hierbij is dat rutine quinone waarschijnlijk veel selectiever met bepaalde cellulaire proteïnen reageert dan ROS. Een van deze proteïnen zou Keap1 kunnen zijn. Keap1 functioneert als sensor voor bepaalde stoffen. Zo reageert acroleïne net als andere alkenal-achtige stoffen zoals 4-hydroxy-2-nonenal, met cysteïne 288 van Keap1, terwijl rutine quinone met cysteïne 151 reageert (6). Cysteïne 288 bevindt zich in de zogenaamde 'intervening region' en cysteïne 151 in het 'Bric-à-Brac (BTB)' domein van Keap1. Binding

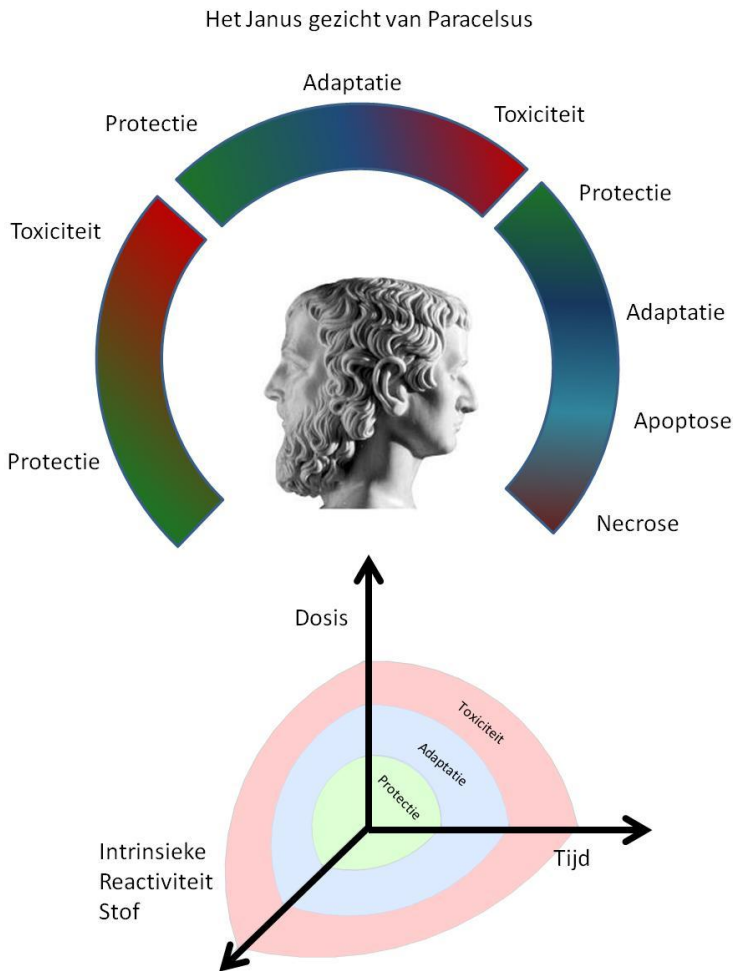
aan cysteïne 288 zal tot een conformationele verandering leiden, terwijl binding aan cysteïne 151, interfereert met de dimeer vorming van Keap1 en binding aan het cytoplasmatische cytoskelet (17). In beide gevallen, zal de interactie van Keap1 met Nrf2 worden aangetast, hetgeen leidt tot een activatie van endogene antioxidant genen downstream. De verzameling aan cysteïnes in Keap1 die reageren, is afhankelijk van de stof. Naast de effecten gerelateerd aan Keap1, zouden ook de GSH levels in de tijd gemeten kunnen worden en is het van belang de invloed hiervan op NO productie en daarmee geassocieerde vasorelaxatie te analyseren. Verder zou het nieuwe mechanisme dat de langdurige bescherming door rutine verklaart, ook in de toekomst kunnen bijdragen aan een beter begrip hoe rutine het risico op het ontwikkelen van CVD kan verminderen. Tot slot zou ook getest kunnen worden of andere flavonoiden met een klein verschil in chemische structuur, adaptatie kunnen induceren. Wellicht zal een verschil in hardheid van het flavonoid molecuul, bepalen hoe potent de adaptatie is die wordt geïnduceerd en hoe stabiel de adducten zijn met Keap1.

Met betrekking tot het onderzoek van acroleïne en MGST1, zou kunnen worden uitgezocht of de binding van acroleïne aan amino groepen van MGST1, de enige oorzaak is van de remming van het enzym. Om dit te verifiëren zouden de amino groepen chemisch afgeschermd kunnen worden, alvorens MGST1 bloot te stellen aan hoge concentraties van acroleïne of lange incubatietijden met acroleïne. Tot slot, zou de specifieke amino groep-gemedieerde remming van MGST1 gevalideerd moeten worden in tumor cellen. Zo zou een mogelijke rol van de aminogroepen als aangrijpingspunt om de resistentie tegen antikanker geneesmiddelen tegen te gaan kunnen worden geverifieerd. Waarschijnlijk is acroleïne in dit geval geen geschikte stof, maar flavonoid quinonen zouden overwogen kunnen worden. Wanneer een flavonoid, die ook aanwezig in onze dagelijkse voeding, als therapie wordt gebruikt, wordt deze ook wel gedefinieerd als nutraceutical.

Of de gemeten apoptose geïnduceerd door quercetine quinone een gevolg is van de GAPDH translocatie naar de nucleus, kan worden bevestigd met een (tijdelijk) knock out model voor GAPDH in de kern. Een tweede suggestie voor toekomstig onderzoek is om ook het GAPDH-quercetine adduct in de cel te laten zien.

Ten slotte, zijn er indicaties dat adaptatie ook *in vivo* plaatsvindt. Zo hebben chronische rokers bijvoorbeeld meer GSH in hun long epitheelvloeistof dan niet-rokers of acute rokers (18). Alhoewel, in dit geval moet nog bevestigd worden of blootstelling aan een lage dosis van een bepaalde stof op termijn beschermt tegen blootstelling aan een hoge dosis van dezelfde of een andere stof met hetzelfde adaptatie mechanisme. Toch zal de risico evaluatie van toxische stoffen zeker veranderen als gevolg van deze bevinding. De maatschappelijk gevolgen zullen ongetwijfeld ethische vraagstukken oproepen.





**Figuur 1: Paracelsus vanuit Janus bekeken: het paradigma van Paracelsus, “Sola dosis facit venenum”, heeft zich in de loop der tijd ontwikkeld rekening houdend met de dosis, tijd en intrinsieke activiteit van de desbetreffende stof.**

### 3 Conclusie

Het paradigm van Paracelsus heeft zich in de loop der tijd ontwikkeld (Figuur 1). Terugkijkend stelde hij in 1500: 'Sola dosis facit venenum' (in het Nederlands: De dosis maakt het gif), dat betekent dat iedere stof uiteindelijk toxisch zal zijn, afhankelijk van de dosis die je toedient. Bij een lage dosis, kunnen de verdedigingssystemen in ons lichaam bescherming bieden zoals het GSH en Thioredoxin (Trx) redox systeem. Bij een te hoge

dosis, raken deze beschermingssystemen verzadigd en kan een stof toxische effecten induceren. In deze thesis, hebben wij het paradigma van Paracelsus verfijnd door een extra dimensie aan te brengen in de range tussen protectie en toxiciteit: namelijk adaptatie. Wanneer een stof net niet toxisch is, en de protectie systemen niet volledig kunnen beschermen, zal deze stof selectief specifieke pathways induceren die bijdragen tot adaptatie en bescherming op de langere termijn, bijvoorbeeld een toename in transcriptie van endogene antioxidant enzymen. Dit is het huidige paradigma, dat verder geïllustreerd is in deze thesis. Dit paradigma blijft echter, net als het leven op aarde, voortdurend aan verandering onderhevig en zal zich in de toekomst verder ontwikkelen. Zo zullen er naar verwachting in de toekomst additionele niveaus en sub niveaus worden toegevoegd. Toxiciteit kan al worden onderverdeeld in apoptose en necrose. Sommige stoffen stimuleren apoptose, zoals quercetine quinone, terwijl andere necrose bevorderen, bijvoorbeeld  $H_2O_2$  dat oxidatieve stress induceert. Hiernaast kan er nog een andere dimensie worden toegevoegd, namelijk de dimensie van de intrinsieke reactiviteit van bepaalde stoffen of de aard van de stof. Een van de strategieën binnen de toxicologie is om te beschermen tegen de reactiviteit van een bepaalde stof door deze te neutraliseren. Zo werd een antioxidant oorspronkelijk toegevoegd om de reactiviteit van ROS te verzwakken. In het huidige paradigma, wordt de reactiviteit selectief gestuurd. De reactiviteit van ROS wordt niet verzwakt, maar een antioxidant zoals quercetine wordt toegevoegd, om vervolgens door ROS te worden omgezet in quercetine quinone dat selectief adaptatie induceert door de expressie van endogene antioxidant systemen te verhogen, die vervolgens kunnen beschermen tegen een toekomstige blootstelling aan ROS. Afhankelijk van de omstandigheden, kan adaptatie gunstig of schadelijk zijn. Het versterken van de endogene antioxidant respons in tumorcellen is een niet gewenste adaptatie, terwijl toxiciteit, in het bijzonder apoptose, voordelig kan zijn in een kanker cel. Echter, hoe dit paradigma zich in de toekomst zal ontwikkelen en wat we kunnen doen om dit proces te sturen, zal de toekomst uitwijzen. Tempus omnia revelat.

## 4 Referenties

1. Davies KJ. Adaptive homeostasis. *Mol Aspects Med.* 2016 Jun;49:1-7.
2. Mattson MP. Hormesis defined. *Ageing research reviews.* 2008 Jan;7(1):1-7.
3. Sthijns MM, Weseler AR, Bast A, Haenen GR. Time in Redox Adaptation Processes: From Evolution to Hormesis. *International journal of molecular sciences.* 2016 Sep 29;17(10).
4. Sthijns MM, Thongkam W, Albrecht C, Hellack B, Bast A, Haenen GR, et al. Silver nanoparticles induce hormesis in A549 human epithelial cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA.* 2017 Jan 18.
5. Sthijns MM, Randall MJ, Bast A, Haenen GR. Adaptation to acrolein through upregulating the protection by glutathione in human bronchial epithelial cells: the materialization of the hormesis concept. *Biochemical and biophysical research communications.* 2014 Apr 18;446(4):1029-34.
6. McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, Hayes JD. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 02;107(44):18838-43.
7. Nassini R, Materazzi S, Andre E, Sartiani L, Aldini G, Trevisani M, et al. Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2010 Dec;24(12):4904-16.
8. Ursini CL, Cavallo D, Freseigna AM, Ciervo A, Maiello R, Buresti G, et al. Differences in cytotoxic, genotoxic, and inflammatory response of bronchial and alveolar human lung epithelial cells to pristine and COOH-functionalized multiwalled carbon nanotubes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:359506.
9. Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S, Moreau K, Baeza-Squiban A, Gaiser BK, et al. An in vitro assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrol.* 2013 Apr 25;14:96.
10. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, et al. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med.* 2011 Jun 01;34(3):E163-71.

11. Jacobs H, Moalin M, Bast A, van der Vijgh WJ, Haenen GR. An essential difference between the flavonoids monoHER and quercetin in their interplay with the endogenous antioxidant network. *PLoS One*. 2010 Nov 08;5(11):e13880.
12. Ursini F, Maiorino M, Forman HJ. Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox biology*. 2016 Aug;8:205-15.
13. Forman HJ, Davies KJ, Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free radical biology & medicine*. 2014 Jan;66:24-35.
14. Thengchaisri N, Hein TW, Wang W, Xu X, Li Z, Fossum TW, et al. Upregulation of arginase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impairs endothelium-dependent nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006 Sep;26(9):2035-42.
15. Ugusman A, Zakaria Z, Chua KH, Nordin NA, Abdullah Mahdy Z. Role of rutin on nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:169370.
16. van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, ten Klooster JP, et al. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2002 May 01;115(Pt 9):1837-46.
17. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology*. 2013 Jan 18;1:45-9.
18. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277(6 Pt 1):L1067-88.